

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 688 005

(21) N° d'enregistrement national :

92 02398

(51) Int Cl⁵ : C 07 K 7/06, 7/08, G 01 N 33/547

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 28.02.92.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 03.09.93 Bulletin 93/35.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : UNIVERSITE MONTPELLIER II -
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC —
FR.

(72) Inventeur(s) : Rolland Marie-Paule, Bitri Lotfi, Lafont
Jacques et Besançon Pierre.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Armengaud Ainé.

(54) Moyens pour le contrôle de produits renfermant des protéines laitières.

(57) L'invention se rapporte à des peptides capables de
former des anticorps susceptibles de réagir spécifiquement
avec une protéine laitière d'une espèce donnée. Ces anti-
corps et les immunosérum les renfermant permettent de
contrôler la présence d'une telle protéine laitière dans des
produits par exemple alimentaires ou cosmétiques.

FR 2 688 005 - A1



MOYENS POUR LE CONTROLE DE PRODUITS RENFERMANT DES PROTEINES LAITIERES

5

L'invention a pour objet des moyens pour le contrôle de produits renfermant des protéines laitières.

Elle se rapporte plus spécialement à des peptides 10 immunogènes et aux anticorps formés contre ces peptides ainsi qu'à l'utilisation de ces anticorps dans une méthode immunologique de détection de protéines laitières d'une espèce animale donnée dans un produit à contrôler.

15 Par "protéines laitières", on désigne, dans la description et les revendications, aussi bien les protéines de lait, que des fractions protéiques de lait ou des dérivés protéiques de lait, quelles que soient leur nature et leur origine ; ou les peptides dérivés. Il s'agit de 20 protéines naturelles, ou obtenues par voie de synthèse, ou encore de protéines recombinantes telles que préparées selon les techniques du génie génétique.

25 L'invention vise, notamment, la détection d'adultérations ou de mélanges de produits laitiers provenant d'une espèce animale donnée avec des laits ou composants laitiers d'autres espèces.

En matière par exemple de fabrication de produits 30 laitiers, dans les pays industrialisés, les usages vernaculaires ont peu à peu été codifiés. Dans le but de garantir au consommateur la conformité du produit, l'un des critères exigés est l'indication de l'espèce animale dont doit provenir le lait utilisé pour l'élaboration du produit 35 laitier.

Si, en Europe, l'essentiel des productions laitières et fromagères provient de l'espèce bovine, les

5 pays méditerranéens produisent aussi du lait de brebis et du lait de chèvre à des coûts très différents du lait de vache, ce dernier étant par exemple trois à quatre fois moins cher que le lait de brebis. Il en résulte des risques de fraudes par coupage.

10 On sait que certains mélanges sont autorisés sous certaines conditions en particulier d'étiquetage, par exemple l'addition de lait de vache, ou dérivés, à du lait de chèvre. Il est donc indispensable de pouvoir contrôler le mélange effectué.

15 Par ailleurs, l'addition de produits laitiers issus de technologies séparatives peut être autorisée. Ces additifs, jusqu'à présent exclusivement issus du lait de vache, sont des protéines purifiées : caséinates, protéines du lactosérum. Leur utilisation constitue donc un autre type d'adultération possible.

20 Enfin, le marché des produits laitiers évolue :

- importations de lait de brebis ou de chèvre ;
- mise sur le marché de fromages mixtes (mélanges de vache ou chèvre dans brebis, de vache dans chèvre), certains en provenance de pays dans lesquels les codifications ne sont pas clairement établies.
- utilisation de produits laitiers comme ingrédients dans de nombreuses préparations.

35 La recherche d'adultérations interspécifiques, accidentelles ou frauduleuses, des produits laitiers, ou de manière générale de produits renfermant des protéines laitières, correspond donc à une préoccupation majeure.

De nombreuses méthodes analytiques ont été proposées pour identifier le lait de différentes espèces

(en particulier celui de vache, brebis et chèvre) au travers de ses composants et le détecter spécifiquement dans des produits plus ou moins remaniés comme par exemple les fromages, pour lesquels les procédés technologiques de fabrication (tels que pasteurisation, stérilisation, ultrafiltration) et les processus d'affinage amènent un remaniement qualitatif et quantitatif complet du produit.

Actuellement, les méthodes les plus sensibles et les plus rapides de mise en œuvre font appel aux techniques d'isoélectrofocalisation et aux techniques immunologiques. Cependant, ces techniques présentent toutes des inconvénients :

- sensibilité à la protéolyse dans le cas de l'isoélectrofocalisation, l'interprétation des électrophorégrammes devenant compliquée lorsque les protéines ont été protéolysées puisque de nombreuses bandes parasites apparaissent,

- présence de faux négatifs dans le cas de l'isoélectrofocalisation et des techniques immunologiques utilisant comme marqueurs des protéines sériques thermocoagulables, qui ne sont plus détectées si le lait de départ a subi un traitement thermique.

Le choix de marqueurs caractéristiques d'une espèce à rechercher, en l'occurrence l'espèce bovine, est le principal problème à résoudre vu la faible distance phylogénétique entre les trois espèces de polygastriques considérées (bovine, ovine, caprine).

Les travaux effectués par les inventeurs dans ce domaine les ont conduits à constater que le choix dans une protéine laitière d'une séquence peptidique particulière permettait de disposer par voie de synthèse de produits se révélant de manière inattendue fortement immunogènes, et

capables en conséquence de former des immunsérums monospécifiques vis-à-vis des protéines à rechercher.

5 L'invention a donc pour but de fournir des peptides possédant des propriétés immunogènes, capables de conduire à des immunsérums et des anticorps utilisables comme marqueurs de protéines laitières d'une espèce donnée.

10 Elle vise également à fournir un procédé de préparation de ces immunsérums et anticorps.

15 L'invention vise en outre à fournir une méthode immunologique de détection qualitative et d'évaluation quantitative d'adultérations ou de mélanges interspécifiques dans les produits renfermant des protéines laitières, cette méthode permettant de résoudre les problèmes posés jusqu'à alors, en particulier ceux résultant de la protéolyse et des traitements thermiques, tout en maintenant les seuils de sensibilité et la rapidité de mise 20 en oeuvre.

25 Les peptides selon l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont capables de former des anticorps polyclonaux susceptibles de reconnaître de manière spécifique, en donnant lieu à une réaction du type antigène-anticorps, une protéine laitière d'une espèce donnée.

30 L'expression "de manière spécifique" signifie que les anticorps forment un complexe avec la protéine laitière considérée, en utilisant la méthode ELISA décrite dans les exemples. De plus, ils ne réagissent pas significativement de manière croisée avec des séquences peptidiques de protéines laitières d'autres espèces.

35

Dans une disposition préférée de l'invention, la séquence en acides aminés des peptides est formée par un fragment de la protéine laitière reconnue par les anticorps

polyclonaux. Ce fragment correspond plus spécialement à une région de la séquence primaire de la protéine laitière d'une espèce donnée où le nombre d'acides aminés différents est important par rapport à la région correspondante dans les séquences primaires de cette même protéine dans d'autres espèces. Il s'agit en particulier d'un fragment de 5 à 20 acides aminés environ.

Compte tenu des applications immunologiques envisagées pour la détection de protéines laitières, bovines, des peptides préférés de l'invention sont constitués par des fragments de telles protéines.

Ces peptides correspondent avantageusement à un fragment de la kappa caséine bovine ou de caséinomacropeptide ou de l' α_1 caséine bovine. En variante, il s'agit de fragments de la β caséine.

L'invention vise également les peptides ci-dessus dans lesquels un ou plusieurs acides aminés de leurs séquences sont différents, substitués, ou déletés, par rapport au fragment correspondant de la protéine laitière, dès lors que ces altérations n'affectent pas la reconnaissance spécifique avec les anticorps comme défini ci-dessus.

Les peptides de l'invention sont aisément obtenus selon les techniques classiques de synthèse peptidique en phase solide telles que celles décrites par Hanin V. Thèse Université de Montpellier II, 1990. La chaîne peptidique est construite sur un support, en particulier une résine du type des résines acryliques. La présence de liaisons amides dans la composition de ces résines polyacryliques les rend relativement proches d'une structure protéique. On peut alors faire jouer à la résine le rôle de la protéine porteuse en utilisant directement le complexe résine-peptide comme immunogène, sachant que les peptides seuls sont trop courts pour induire une réponse immunitaire

appréciable. Cette méthodologie présente l'avantage de conduire à une configuration plus homogène du complexe peptide-résine par rapport à celle d'un complexe peptide-protéine porteuse.

5

L'invention vise également, en tant que nouveaux produits, les immunsérumms contenant des anticorps capables de reconnaître spécifiquement une protéine laitière d'une espèce donnée et les anticorps correspondants.

10

Les immunsérumms et anticorps polyclonaux sont avantageusement tels qu'obtenus, de manière classique, par immunisation d'animaux avec un peptide tel que défini ci-dessus dont la séquence est spécifique d'une espèce donnée.

15

En suivant les méthodes usuelles, on administre un complexe peptide-support, notamment peptide-résine à l'animal, par voie intradermique, à raison d'environ 0,3 à 1 mg de peptide, en émulsion dans un adjuvant capable de stimuler au maximum la réponse immunitaire, tel que l'adjuvant complet ou incomplet de Freund. L'injection est renouvelée plusieurs fois, à intervalles de temps, généralement de 15 jours à 1 mois.

25 Les immunsérumms sont obtenus à partir des prélèvements sanguins, effectués sur les animaux immunisés, après élimination des hématies par coagulation et centrifugation. Ils sont conservés dans les conditions habituelles par exemple sous forme congelée ou lyophilisée.

30

35 L'estimation du taux d'anticorps spécifiques, présents dans les immunsérumms totaux recueillis tout au long du programme d'immunisation, est réalisée par exemple grâce à une technique immunométrique dite "par capture d'anticorps", en utilisant le complexe résine-peptide comme antigène. L'apparition des anticorps est relativement rapide à partir de la première injection et leur production est croissante au cours du programme d'immunisation jusqu'à

atteindre un maximum au-delà duquel elle décroît. Il a donc été possible de vérifier que le lapin, par exemple, produit des anticorps à partir d'une séquence peptidique de synthèse dont la taille est inférieure ou égale à quinze résidus d'acides aminés.

Les immunsérum et anticorps de l'invention sont en outre caractérisés en ce qu'ils donnent lieu à une réaction du type antigène-anticorps aussi bien avec un peptide tel que défini ci-dessus, qu'avec la protéine mère renfermant la même séquence, mais qui présente une structure plus complexe avec des repliements dans l'espace de la chaîne polypeptidique, pouvant rendre les épitopes concernés inaccessibles pour les anticorps.

De manière avantageuse, les immunsérum et anticorps anti-peptides de l'invention, confrontés aux caséines totales ainsi qu'aux différentes caséines individuelles constitutives bovines (respectivement α et kappa caséines) reconnaissent leurs épitopes dans chaque cas.

Dans les mêmes conditions, cette reconnaissance n'est pas retrouvée quand les protéines homologues ovines ou caprines sont utilisées.

L'invention vise en particulier des immunsérum et anticorps anti- $\alpha\text{-s1}$ caséine bovine et des immunsérum et anticorps anti-caséino-macropeptide bovin.

Les anticorps polyclonaux sont récupérés à partir des immunsérum selon les techniques classiques. Ils peuvent être purifiés par exemple par chromatographie d'affinité.

Les anticorps monoclonaux tels qu'obtenus en opérant selon la technique de Köhler et Milstein dans

Nature, vol 256, p. 495, 1975, font également partie de l'invention.

5 Celle-ci vise également tout fragment de ces anticorps polyclonaux ou monoclonaux dès lors qu'il est capable d'interagir spécifiquement avec des épitopes de la protéine laitière à détecter.

10 Les études immunologiques réalisées avec les immunsérum et anticorps de l'invention mettent en évidence leur monospécificité vis-à-vis d'une protéine laitière d'une espèce donnée. Elles montrent également, comme illustré dans les exemples, que leur immunoréactivité n'est pas affectée par un traitement thermique ou une hydrolyse 15 partielle des antigènes.

20 L'invention vise donc également l'application de ces immunsérum et anticorps en tant que bioréactifs pour la détection in vitro d'une protéine laitière donnée dans un produit à contrôler.

25 Dans cette application, les anticorps sont libres. En variante, ils sont fixés sur un support immunologiquement inerte.

30 La méthode de contrôle de la présence de protéines laitières dans un produit est caractérisée par
- la mise en contact du produit à contrôler avec une préparation d'immunsérum ou d'anticorps tels que définis ci-dessus, immobilisés sur un support solide, dans des conditions appropriées pour la production d'un complexe du type antigène-anticorps avec la protéine laitière, suivie de
- la mise en évidence de la formation d'un tel complexe.

35 Pour révéler la réaction immunologique, on utilise un deuxième anticorps couplé à un groupement dont l'activité peut être mesurée telle une enzyme, comme la

phosphatase alcaline, la peroxydase ou le β -galactosidase, ou un groupement fluorescent, luminescent ou encore radioactif.

5 Cette méthode de détection permet de révéler avec une grande sensibilité, jusqu'à 0,1 % (volume/volume) une protéine laitière d'une espèce animale donnée dans un échantillon à contrôler.

10 Le degré de sensibilité dépend toutefois de l'ajustement des paramètres du dosage (notamment de la dilution de l'immunsérum, de la quantité de protéine cible sensibilisant le support, de la préparation des échantillons à doser), ainsi que des performances de 15 l'immunsérum. Ainsi d'un animal à l'autre, l'immunsérum produit aura une plus ou moins grande affinité pour ses épitopes respectifs. La meilleure sensibilité sera atteinte en utilisant des immunsérum sélectionnés pour leur affinité, ainsi qu'en déterminant, pour chacun d'eux, selon 20 les techniques courantes dont dispose l'homme de l'art, la dilution adéquate d'utilisation et la quantité d'antigène à utiliser pour sensibiliser le support.

25 L'échantillon à analyser provient d'un produit renfermant des protéines laitières. Il s'agit en particulier d'une part de produits alimentaires, parmi lesquels on distinguera les produits laitiers ou dérivés du lait, ainsi que la charcuterie, la confiserie comme le nougat ou les tourtons, ou encore les biscuits ou autres 30 pâtisseries ; d'autre part des produits et préparations cosmétiques renfermant des protéines laitières.

35 En vue de leur dosage, les produits laitiers sont au préalable soumis à une étape de délipidation, suivie de précipitation des caséines et d'ajustement du pH à environ 7,4. Les lipides sont avantageusement éliminés par centrifugation dans le cas du lait et par extraction à l'aide de solvants organiques pour les fromages.

5 L'invention vise également un kit pour la détection in vitro de la présence d'une protéine laitière d'une espèce animale donnée dans un produit renfermant des protéines laitières.

Ce kit est caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une phase solide appropriée servant de support pour le dosage, telle qu'une plaque de micro-titration, avantageusement sensibilisée au préalable avec l'antigène de l'immunsérum fourni dans le kit,

- une préparation d'immunsérum ou d'anticorps selon l'invention comme définis ci-dessus, libres ou immobilisés,

15 - une préparation d'un deuxième anticorps avec un groupe marqueur,

- un système de détection spécifique du marqueur,

20 - des solutions tampons appropriées pour les réactions immunologiques et pour les réactions de détection.

Le cas échéant, cette présentation comporte en outre des mélanges laitiers servant à l'étalonnage.

25 Pour la sensibilisation de la phase support utilisée pour réaliser le dosage, on utilise une concentration du marqueur immunologique (protéine purifiée ou peptide de synthèse) permettant d'obtenir la meilleure sensibilité du dosage.

30 La préparation d'immunsérum ou d'anticorps spécifiques de la protéine laitière à rechercher est dosée. Elle se présente sous forme lyophilisée ou sous forme liquide, à la dilution d'utilisation.

35 Avantageusement, on la stabilise en ajoutant par exemple des agents bactéricides.

On rapporte dans les exemples qui suivent d'autres caractéristiques et avantages de l'invention.

Les figures 1 à 6 auxquelles il est fait référence 5 représentent respectivement :

- les figures 1 à 3, des courbes d'étalonnage de fromages et de lait de brebis adultérés avec du lait de vache dans différentes conditions.

10

- la figure 4, une courbe d'étalonnage de lait de vache en poudre additionné de lactosérum présure de vache atomisé,

15

- la figure 5, une courbe d'étalonnage pour la détection du lactosérum présure de vache dans les pâtés apertisés, et

20

- la figure 6, l'immunoréactivité d'un immunosérum de l'invention avec différentes protéines laitières.

Exemple 1 : Peptides synthétiques

Deux types de peptides, synthétisés sur résine 25 polyacrylique, sont donnés en exemple.

* Fragment 139-152 de la kappa caséine bovine (14 résidus d'acides aminés)

30

139

152

Val-Glu-Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Asp-Ser-Pro-Glu-Val--
RESINE

35

* Fragment 140-149 de l' $\alpha s1$ caséine bovine (10 résidus d'acides aminés)

140

149

Gln-Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu--RESINE

Le support solide est une résine polyacrylique constituée par un copolymère de N-acryloylpiperidine et de N-acryloyl-β-alanine réticulés par l'éthylène bis acrylamide. On utilise par exemple la résine commercialisée sous la marque Expansive ou encore les résines PepSyn K, KA, KB ou KH, telles que commercialisées par la société Millipore S.A.

10 Les synthèses ont été réalisées à partir de la résine sur laquelle sont fixés de façon covalente les dérivés Fmoc (fluorène-méthoxy carbonyl) des acides aminés correspondant à la partie C-terminale de la chaîne peptidique à synthétiser.

15

Par exemple :

* Fmoc-Ala-PepSyn-KA pour le peptide synthétique correspondant à la kappa caséine bovine.

20

* Fmoc-Leu-PepSyn-KA pour le peptide synthétique correspondant à l'αs1 caséine bovine.

25

La chaîne peptidique est alors allongée vers son extrémité N-terminale par couplage successif des dérivés Fmoc des différents acides aminés à ajouter et l'activation de ceux-ci par le HoBt (1-hydroxybenzotriazole) sur la fonction carbonyle.

30

35

Les dérivés Fmoc des acides aminés protégés ainsi que les réactifs nécessaires aux différentes étapes de la synthèse (rinçages, réactifs de déprotection...) sont

également disponibles commercialement par exemple chez la société Millipore.

5 Les synthèses peptidiques ont été réalisées en flux continu sur un appareil automatique Milligen Pepsynthesizer model 9050, commercialisé par exemple par la société Millipore.

10 Chaque étape de la synthèse est contrôlée, car un photomètre en sortie permet de vérifier à la fois la réaction de couplage et la réaction de déprotection puisqu'aussi bien les dérivés Fmoc que le pipéridyl dibenzofulvène, produit lors de la déprotection des dérivés Fmoc, ont une intense absorption dans l'UV. L'appareil 15 s'arrête alors de fonctionner si le couplage est incomplet. Ainsi, le suivi du protocole par l'homme de l'art permet de garantir la séquence peptidique prédéterminée..

20 Une fois la synthèse effectuée, les différentes fonctions protectrices des acides aminés sont clivées par traitement au TFA (acide trifluoroacétique) 95 % / eau millipore 5 %, puis le peptide-résine est recueilli, séché 5 minutes sous azote, 30 minutes sous-vide à la trompe à eau, puis 14 heures environ sous-vide poussé à la pompe à 25 palettes.

30 Le rendement de couplage ainsi que la composition en acides aminés des préparations sont contrôlés par analyse HPLC après hydrolyse des résine-peptides 48 heures à 110°C dans HCl 6N.

Les rendements de couplage obtenus sont, par exemple :

35 * Peptide synthétique de kappa caséine bovine :
0,351. 10⁻³ mole peptide/g de peptide-résine.

* Peptide synthétique de l'αs1 caséine bovine :
0,354. 10⁻³ mole peptide/g de peptide-résine.

Exemple 2 : Procédure d'immunisation et préparation des immunsérum

5 Le complexe résine-peptide à 2 mg de peptide/ml dans une solution de NaCl 0,9% est émulsionné volume à volume dans un adjuvant huileux type adjuvant complet ou incomplet de Freund. 0,3 à 1 mg de peptide sont ainsi injectés par voie intradermique en points multiples à un
10 lapin.

L'injection est renouvelée plusieurs fois à intervalle de temps de 15 jours à 1 mois.

15 Les prélèvements sanguins sont effectués une dizaine de jours après l'injection. Le sang est centrifugé pour éliminer les hématies, puis le sérum est récolté.

Exemple 3 : Préparation des échantillons

20 **LAIT :** Le lait est dégraissé par centrifugation, puis les caséines sont précipitées par acidification.

Une deuxième centrifugation permet de récupérer un culot riche en caséines et une phase sérique.

25 Le culot est dissous par addition de NaOH 2N, dilué dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20, puis amené à un pH de 7,4. Le lactosérum est neutralisé de la même façon par addition de NaOH 2N jusqu'à pH 7,4.

30 Des dilutions croissantes de chaque échantillon (caséines, lactosérum) sont alors réalisées dans du PBS-Tween.

35 **FROMAGE :** 10 g de fromage sont homogénéisés dans 25ml d'eau distillée. L'extraction des lipides est effectuée par mélanges et décantations successives de cet homogénat dans une phase organique (par exemple chloroforme-méthanol).

La phase aqueuse est collectée et les traces de solvants organiques sont évaporées sous vide. L'extrait de

fromage ainsi dégraissé est traité et analysé dans les mêmes conditions que le lait.

5 **Exemple 4 : Méthode de détection de protéines laitières d'une espèce donnée selon la technique ELISA**

Le principe du dosage est le suivant :

Un support, par exemple les cupules d'une plaque de microtitration, susceptible de lier de façon non covalente les protéines, est sensibilisé avec l'antigène purifié, donc la protéine cible à rechercher dans le produit à doser (αs_1 caséine, kappa caséine ou caséinomacropeptide bovin ou peptide synthétique correspondant). L'échantillon à doser est alors incubé sur ce support en présence d'une quantité précise d'anticorps spécifiques. Au cours de cette incubation, il y a compétition pour les anticorps entre les protéines cibles adsorbées sur le support et celles libres dans le milieu.

20 A l'équilibre, les anticorps fixés par la protéine cible liée sont révélés par des anticorps anti-IgG de lapin couplés à une enzyme (par exemple la phosphatase alcaline, la peroxydase ou la β -galactosidase), puis quantifiés par la mesure de l'absorbance du produit coloré de la réaction 25 de l'enzyme sur son substrat.

30 Le taux d'antigène (αs_1 caséine, kappa caséine ou caséinomacropeptide) éventuellement présent dans l'échantillon à analyser est quantifié par sa capacité d'inhiber la fixation des anticorps sur l'antigène adsorbé sur la phase solide.

35 L'analyse en dilution croissante de l'échantillon inconnu, comparativement à des échantillons témoins, permet donc de déterminer la protéine étrangère présente dans l'échantillon.

Exemple 5 : Dosages à l'aide d'immunsérum selon l'exemple 2

Une plaque de microtitration (par exemple NUNC R
5 Maxisorb Type II) est sensibilisée par incubation 12 heures
à 37°C d'une solution protéique d' α caséine bovine d'une
part ou de kappa caséine (ou de caséinomacropeptide ou de
peptide de synthèse) bovine d'autre part, ces protéines
étant purifiées et utilisées à une concentration d'environ
10 0,2 µg/ml.

Les caséines α et kappa bovines purifiées sont
obtenues par fractionnement des caséines totales acides
bovines après chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-
15 Trysacryl R. Le caséinomacropeptide bovin est extrait de
lactosérum présure de vache, par exemple par
chromatographie d'exclusion.

La plaque est ensuite lavée dans du PBS-Tween et
20 les sites potentiels de fixation non spécifiques de
protéines sont bloqués par incubation une heure à 37°C dans
une solution de saturation à 0,5% de gélatine et 3%
d'hydrolysats de gélatine (commercialisés par la société
SIGMA) dans du PBS-Tween.

25 Après un deuxième lavage de la plaque dans du PBS-Tween,
les dilutions de l'échantillon à doser, préparé
comme indiqué dans l'exemple 3, ainsi que l'immunsérum
spécifique dilué dans du PBS-Tween sont introduits dans les
30 trous volume à volume. La plaque est alors incubée, soit
quelques heures à 37°C, soit une nuit à 4°C sous agitation.

Cette troisième incubation est suivie d'un lavage
de la plaque dans le PBS-Tween, puis d'une incubation de 2h
35 à 37°C, en présence d'anticorps anti-IgG de lapin marqués
par une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase ou une
autre enzyme dont le produit est un chromogène), dilués
dans du PBS-Tween.

La plaque est ensuite lavée une dernière fois, puis le substrat de l'enzyme utilisé est introduit (par exemple para-nitrophenyl phosphate dans le cas de la phosphatase alcaline, ortho-phénylène diamine ou analogue pour la peroxydase). L'incubation est réalisée dans les conditions optimales pour l'activité catalytique de l'enzyme utilisée (pH, temps, température, éclairement...).

La mesure du signal est effectuée par lecture de la densité optique de chaque puits à l'aide d'un lecteur de microplaques, à la longueur d'onde d'absorption spécifique du produit de la réaction enzymatique.

Pour étalonner la réaction, on effectue sur la même plaque des essais témoins en utilisant des échantillons contenant par exemple 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 10% de lait de vache.

. Etude de produits laitiers adultérés en lait de vache

Sur les figures 1 à 3, on a représenté les courbes d'étalonnages de produits laitiers adultérés.

Le pourcentage d'adultération (abscisses) est indiqué en fonction de la concentration en protéines totales en µg/ml.

La figure 1 donne la courbe d'étalonnage relative à des fromages à pâte persillée (type roquefort) fabriqués à partir de lait de brebis adultéré avec du lait de vache cru, jusqu'à 3 mois d'affinage.

Les mesures effectuées au bout de 15 jours sont représentées par les symboles (0), au bout de 1 mois par (◐), et de 3 mois par (◑), la moyenne étant représentée par (▲).

La figure 2 donne la courbe d'étalonnage du même produit, mais adultéré avec du lait de vache stérilisé.

L'examen de ces courbes montre d'une part que la protéolyse qui se produit pendant l'affinage n'a pas d'incidence sur les mesures. De même, ces dernières ne sont pas affectées par le traitement thermique subi par le lait.

Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus avec un lait de brebis adultéré avec du lait de vache cru ou chauffé une heure à 110°C.

La courbe d'étalonnage correspondante est donnée sur la figure 3.

15 . Dosage de lactosérum dans du lait de vache en poudre.

On rapporte sur la figure 4 la courbe d'étalonnage de lait de vache en poudre additionné de lactosérum présure de vache atomisé. Le pourcentage de fraude est indiqué en abscisses et la concentration en protéines totales ($\mu\text{g/ml}$) en ordonnées.

25 La courbe (□) correspond à la gamme A, c'est-à-dire à des étalons préparés à partir de lait de vache écrémé atomisé et de lactosérum doux présure de vache atomisé, et la courbe (○) à la gamme B, c'est-à-dire à des étalons préparés à partir de lait de vache écrémé atomisé et de lactosérum présure de vache atomisé traité thermiquement 1 h à 110°C.

30 . Dosage de lactosérum dans des charcuteries

35 L'utilisation des immunsérum de l'invention permet de détecter le lactosérum présure de vache présent dans des charcuteries type pâté, apertisées.

Sur la figure 5, on rapporte la courbe d'étalonnage pour la détection du lactosérum présure de vache dans des pâtes apertisés 80 min à 110°C. La concentration en protéines ($\mu\text{g/ml}$) est donnée en abscisses et le pourcentage de mélange en ordonnées (□) représente la droite de régression et (●) les résultats expérimentaux).

10 g de pâté de foie sont dilués dans 40 ml de PBS contenant 0,05 % de Tween 20, homogénéisés à l'aide d'un ultraturrax, puis maintenus sous agitation une nuit à 25°C.

L'extrait soluble est recueilli par centrifugation (20 min ; 5000 g ; 10°C) puis délipidé par extraction des graisses au chloroforme.

La phase aqueuse est récupérée et les traces de chloroforme sont évaporées sous vide. L'extrait soluble ainsi dégraissé est analysé dans les mêmes conditions que le lait ou le fromage.

Exemple 6 : Etude de la réactivité de l'immunsérum anti- α 1 caséine bovine

25 Sur la figure 6, on a rapporté les résultats de l'étude de l'immunoréactivité de l'immunsérum ci-dessus avec 1) le peptide fabriqué selon l'exemple 1 ; 2) l' α caséine bovine ; 3) l' α caséine ovine ; 4) l' α caséine caprine ; 5) la caséine totale ovine et 7) la caséine totale caprine.

Pour chacun de ces composés indiqués en abscisses, on rapporte en ordonnées, le pourcentage de réponses.

35 On constate à l'examen de cette figure que l'immunoréactivité de cet immunsérum est aussi bonne avec les protéines natives qui contiennent le fragment

peptidique (α caséine ou mélange de caséines) qu'avec le peptide de synthèse de l'invention.

5 De manière avantageuse, on n'observe pas de réaction croisée notable avec les fractions protéiques homologues des autres espèces, ce qui met en évidence la monospécificité des anticorps polyclonaux de l'invention.

10 L'immunsérum anti- α s1 caséine de vache permet la détection de l'addition de lait ou de caséinates de vache à un lait de brebis.

15 L'immunsérum anti-kappa caséine de vache permet la détection de l'addition de lait, de caséinates ou de lactosérum de vache (obtenu par coagulation présure de lait de vache) à des laits de brebis ou de chèvre. Les anticorps fabriqués sont spécifiques du fragment 139-152 de la kappa caséine situé sur le caséinomaclopeptide bovin. Celui-ci, lors de la coagulation des caséines par la présure, est 20 excisé au niveau de la liaison 106-107 de la kappa caséine et se trouve donc soluble dans la phase sérique.

25 Il faut aussi noter que les marqueurs α s1-caséine, kappa caséine ou caséinomaclopeptide choisis pour l'espèce bovine sont thermostables ; leur antigénicité n'est donc pas affectée, quel que soit le traitement thermique qu'a subi le produit laitier ajouté à l'échantillon dont on veut contrôler la pureté.

30 Par exemple, un lait ou un lactosérum présure de vache chauffé 60 min. à 100° C est reconnu de la même façon que s'il était cru.

35 D'autre part, sachant que les haptènes choisis contiennent au moins 5, de préférence au moins 10 résidus d'acides aminés, plusieurs épitopes continus doivent être reconnus sur la protéine cible par les anticorps polyclonaux produits. Une disparition totale de

l'immunoréactivité ne peut donc être envisagée que dans l'hypothèse d'une hydrolyse enzymatique totale, ce qui ne peut se produire, par exemple au cours de la phase d'affinage des fromages, même si on s'adresse à des fromages très affinés.

L'invention fournit donc les moyens de détecter avec une grande précision et une spécificité élevée des fraudes sur des produits laitiers ou de produits les renfermant, tels que les produits alimentaires ou les préparations cosmétiques. Il est ainsi possible de mettre en évidence des adultérations résultant de l'addition de protéines laitières d'une espèce différente de celle(s) devant être utilisée(s) pour se conformer aux normes de fabrication. On peut également détecter l'utilisation par exemple d'hydrolysats de lactosérum utilisés dans ces produits pour augmenter le volume, la capacité de rétention d'eau ou comme succédané à des protéines laitières plus coûteuses.

REVENDICATIONS

5 1/ Peptides, caractérisés en ce qu'ils sont capables de former des anticorps polyclonaux susceptibles de reconnaître de manière spécifique, en donnant lieu à une réaction du type antigène-anticorps, une protéine laitière d'une espèce donnée.

10 2/ Peptides selon la revendication 1, caractérisés en ce que leur séquence en acides aminés est formée par un fragment de la protéine laitière reconnue par les anticorps polyclonaux.

15 3/ Peptides selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un fragment de protéine bovine, notamment d'un fragment renfermant de 5 à 20 acides aminés environ.

20 4/ Peptides selon la revendication 3, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un fragment de la kappa caséine bovine.

25 5/ Peptides selon la revendication 4, caractérisés
en ce qu'il s'agit d'un fragment correspondant à la
séquence 139-152 de la kappa caséine bovine dont
l'enchaînement en acides aminés est le suivant :

30 139 152
Val-Glu-Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Asp-Ser-Pro-Glu-Val--
RESINE

6/ Peptides selon la revendication 3, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un fragment de l' α s1 caséine bovine.

5 7/ Peptides selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un fragment correspondant à la séquence 140-149 de l' α s1 caséine bovine dont l'enchaînement en acides aminés est le suivant :

10 140 149
Gln-Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu--RESINE

15 8/ Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que un ou plusieurs acides aminés de leurs séquences sont différents, ou substitués, ou déletés, par rapport au fragment correspondant de la protéine laitière, ces altérations n'affectant pas reconnaissance spécifique par les anticorps telle que définie dans la revendication 1,

20 9/ Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisés en ce qu'ils sont couplés à un support, en particulier à une résine, telle qu'une résine acrylique.

25 10/ Immunsérum contenant des anticorps capables de reconnaître spécifiquement une protéine laitière d'une espèce donnée et anticorps correspondants, tels qu'obtenus par immunisation d'animaux avec un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

30 11/ Immunsérum et anticorps selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils sont anti- α s1 caséine bovine ou anti-caséinomacropeptide bovin.

35 12/ Procédé d'obtention des immunsérum selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce qu'on administre un complexe peptide-support, notamment peptide-

résine, à l'animal, par voie intradermique, à raison d'environ 0,3 à 1 mg de peptide, en émulsion dans un adjuvant capable de stimuler au maximum la réponse immunitaire, tel que l'adjuvant complet ou incomplet de Freund, qu'on renouvelle l'injection à intervalles de temps, généralement de 15 jours à 1 mois, puis qu'on élimine les hématies.

13/ Méthode de contrôle de produits renfermant des produits laitiers, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact de l'échantillon provenant du produit à analyser avec une préparation d'immunsérum ou anticorps tels que définis dans l'une des revendications 10 ou 11, dans des conditions appropriées pour la production d'un complexe antigène-anticorps, et

- la détection de la liaison immunologique.

14/ Kit pour la détection in vitro de la présence de protéines laitières d'une espèce donnée dans un échantillon de produit à analyser, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une phase solide appropriée servant de support pour le dosage, telle qu'une plaque de micro-titration, avantageusement sensibilisée au préalable avec l'antigène de l'immunsérum fourni dans le kit,

- une préparation d'immunsérum ou d'anticorps selon l'invention comme défini ci-dessus libres ou immobilisés,

- une préparation d'un deuxième anticorps avec un groupe marqueur,

- un système de détection spécifique du marqueur,

- des solutions tampons appropriées pour les réactions immunologiques et pour les réactions de détection.

15/ Application des immunsérum et anticorps selon l'une des revendications 10 ou 11 au contrôle de produits

renfermant des protéines laitières en vue de détecter une protéine laitière d'une espèce donnée.

5 16/ Application selon la revendication 14 au contrôle de produits alimentaires tels que les produits laitiers ou dérivés de lait, ainsi que la charcuterie, la confiserie ou la pâtisserie.

10 17/ Application selon la revendication 14, au contrôle de produits et préparations cosmétiques.

1/6

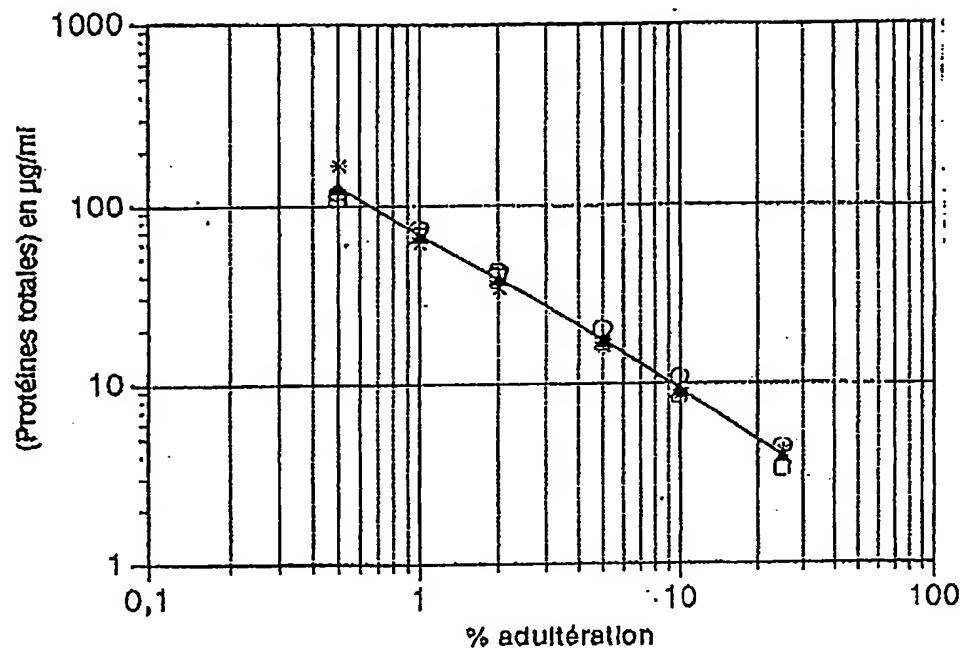


Figure 1

2/6

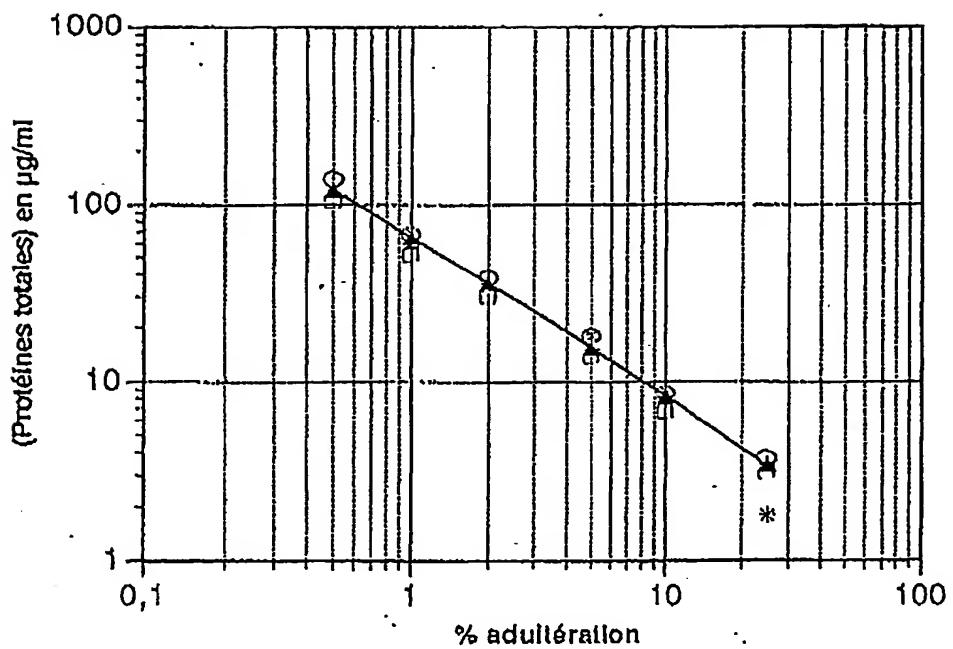


Figure 2

3/6

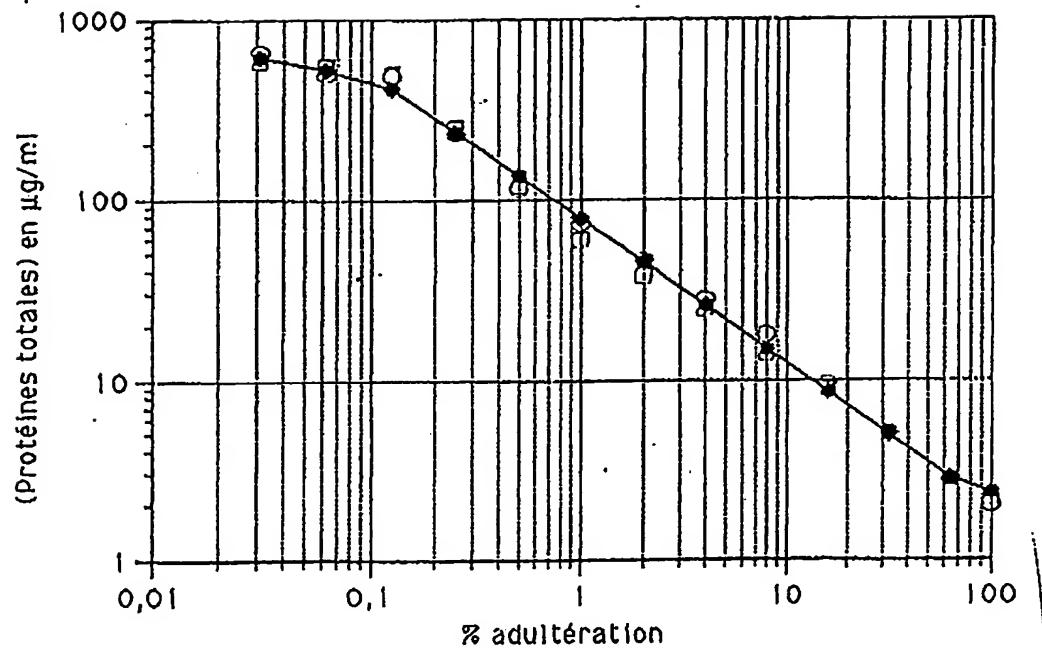


Figure 3

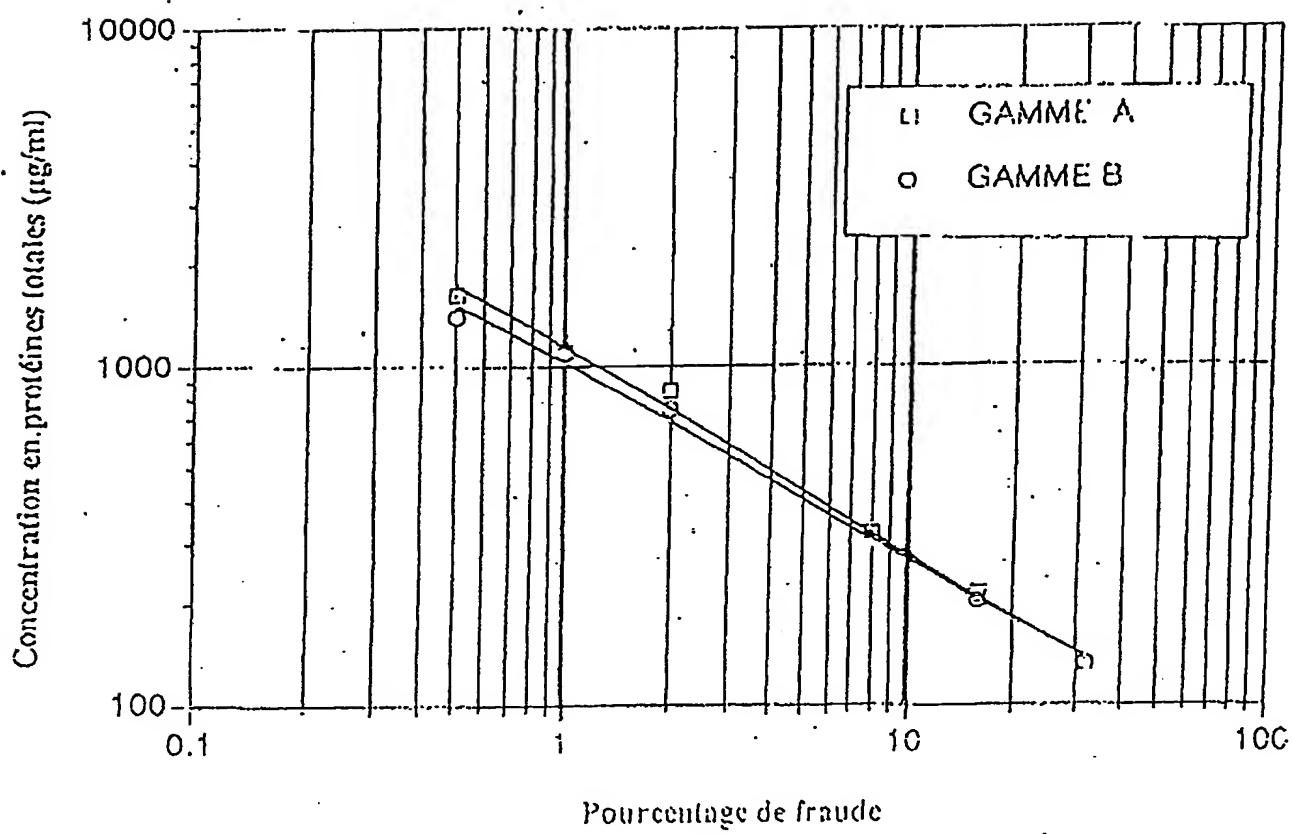


Figure 4

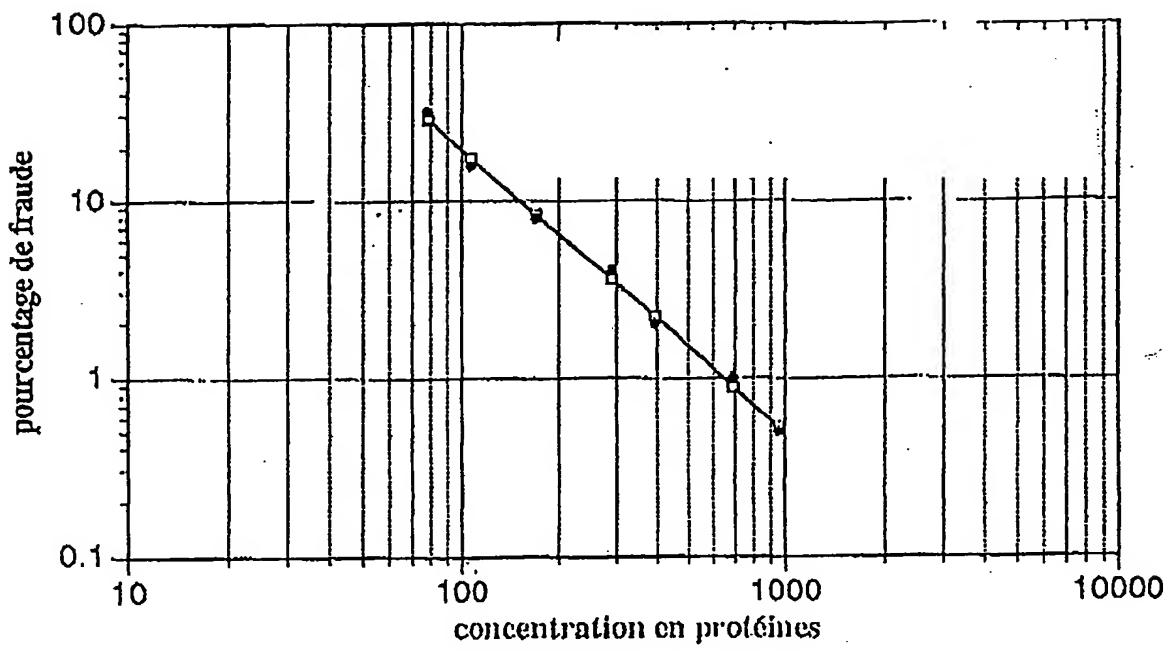


Figure 5

6/6

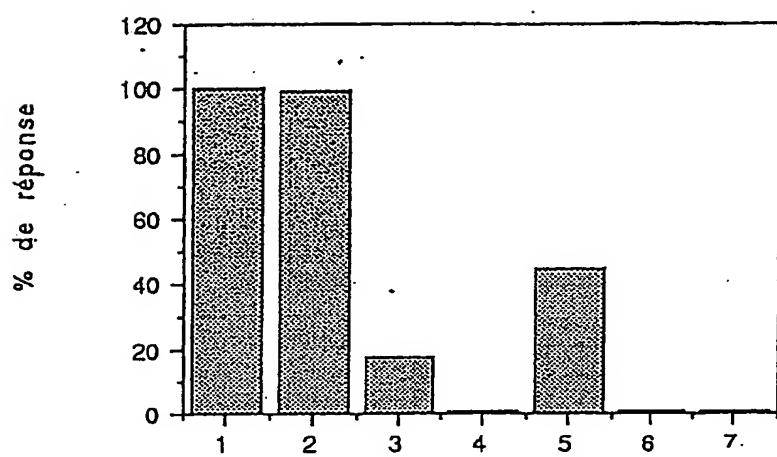


Figure 6

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national
FR 9202398
FA 469510
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. vol. 154, no. 3, 15 Août 1988, DULUTH, MINNESOTA US pages 876 - 882 AKIO AMETANI ET AL. 'Antibody response of three different strains of mice to alpha S1-Casein analyzed by using proteolytic and synthetic peptides.'	1-3, 6, 7, 10
Y	* le document en entier * ---	9, 13, 15, 16
X	JOURNAL OF DAIRY SCIENCE vol. 73, no. 10, 1990, CHAPAIIGN, ILLINOIS US pages 2741 - 2748 KUZMANOFF, KONRAD ET AL. 'Isolation of monoclonal antibodies monospecific for bovine kappa-casein.' *discussion, page 2746* * le document en entier * ---	1, 4
X	EP-A-0 049 666 (INSERM) 14 Avril 1982 * page 4; revendications * ---	1-3, 10
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 5, 30 Juillet 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 37431u, KUBOTA, TAKAAKI ET AL. 'Casein degradation products in immunoassays to remove interferences' page 315 ; * abrégé * & JP-A-2 036 353 (TEIJIN) 6 Février 1990 ---	1-3, 10
2		-/-
Date d'achèvement de la recherche 13 NOVEMBRE 1992		Examinateur DELANGHE L.L.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9202398
FA 469510
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie		
X	<p>HELVETICA CHIMICA ACTA. vol. 55, no. 291, 1972, BASEL CH pages 2872 - 2882</p> <p>JACQUELINE JOLLES ET AL. 'Studies on the primary structure of cow kappa-casein. Structural features of para-kappa-casein; N-terminal sequence of kappa-caseinoglycopeptide studied with a sequencer.'</p> <p>* le document en entier *</p> <p>---</p>	1-4
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 15, 13 Avril 1987, Columbus, Ohio, US; abstract no. 118237t,</p> <p>ALAIS, CHARLES 'Determination of skimmed milk powder in animal feed mixtures.'</p> <p>page 509 ;</p> <p>* abrégé *</p> <p>& RIV.SOC.ITAL.SCI.ALIMENT.</p> <p>vol. 15, no. 4, 1986, FR</p> <p>pages 221 - 224</p> <p>---</p>	1, 13, 15, 16
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 11, 15 Septembre 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 93613b,</p> <p>KUMAKURA, MINORU ET AL. 'Immobilization of biologically active substances.'</p> <p>page 289 ;</p> <p>* abrégé *</p> <p>& JP-A-61 015 898 (AJINOMOTO)</p> <p>23 Janvier 1986</p> <p>---</p>	1, 9
2		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 5)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
13 NOVEMBRE 1992		DELANGHE L.L.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul</p> <p>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</p> <p>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général</p> <p>O : divulgation non-écrite</p> <p>P : document intercalaire</p>		
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention</p> <p>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.</p> <p>D : cité dans la demande</p> <p>L : cité pour d'autres raisons</p> <p>.....</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9202398
FA 469510
Page 3

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	<p>DATABASE WPIL Section Ch, Week 9229, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 92 235927 & ES-A-2 027 899 (UNIV COMPLUTENSE MADRID) 16 Juin 1992 * abrégé *</p> <p>-----</p>	1-17
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
2		
	Date d'achèvement de la recherche 13 NOVEMBRE 1992	Examinateur DELANGHE L.L.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant